

環境水質のバイオアッセイによる評価に関する研究

研究期間（平成13年度～14年度）

志水信弘*, 池浦太荘*

県内の河川水質について、環境ホルモン調査を他種類の化学物質を対象として化学分析、バイオアッセイの2種類の評価方法について行った。

各物質の河川中濃度範囲は、ノニルフェノール（検出：4地点、濃度範囲：未検出～0.14 $\mu\text{g/L}$ ）、4-*t*-オクチルフェノール（検出：4地点、濃度範囲：未検出～0.006 $\mu\text{g/L}$ ）、ビスフェノール A（検出：7地点、濃度範囲：未検出～0.12 $\mu\text{g/L}$ ）であった。この調査によって県内の河川においても、環境ホルモンが検出されが、すぐに生態系に影響を与えるレベルではないと考えられた。

一方、バイオアッセイにより河川水中の環境ホルモン活性を検出し、17- β -エストラジオール換算値として計算した結果、環境ホルモン活性が3地点で検出され濃度範囲は未検出～0.082 ng/L であった。さらにバイオアッセイで検出された環境ホルモン活性の強度は、化学分析による環境ホルモン濃度から予想される強度よりも高いものもあった。このことから、化学分析では現在検出されていない環境ホルモンが、県内の河川環境中にも存在する可能性が明らかになった。

[キーワード：バイオアッセイ、内分泌攪乱化学物質、酵母ツーハイブリッド法、エストラジオール]

1 はじめに

近年の化学物質による環境の汚染は、多種類の化学物質による低濃度の広範囲な汚染が特徴である。このような汚染に対して、個々の物質に関して化学分析によるリスク評価は難しいと考えられる。一方、バイオアッセイによる評価では、水質中の化学物質のリスクを包括的に評価できる。また、バイオアッセイは、環境モニタリング技術として注目されており、次世代の分析技術として基礎研究を進めておく必要がある。

内分泌攪乱化学物質は、その種類も多く、多くの物質について内分泌攪乱活性の有無や分析方法が確定されて。そのため、化学分析によるリスク評価によりすべての影響を検討することは難しい。一方、上述の通りこのような環境中のリスク評価には、バイオアッセイが適当である。

そこで、内分泌攪乱化学物質のうち、特に女性ホルモン活性を検出できる酵母ツーハイブリッド法を用いてリスク評価を行った。同時に内分泌攪乱化学物質や農薬等の化学分析を行い、化学分析によるリスク評価と環境モニタリングに関するバイオアッセイによるリスク評価との比較検討を行った。

2 研究方法

2・1 調査地点、一般水質

調査地点は、図1中の二重丸で示すように、A から I の9つの地点を選定した。試料の採取は、平成15年2月13日に行った。

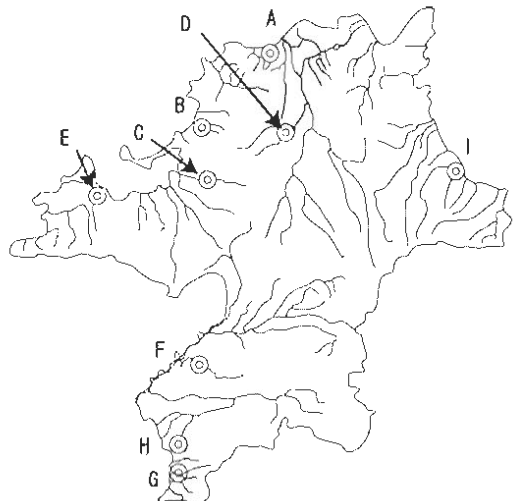


図1 調査地点

河川水は、ステンレス製のバケツおよび漏斗を使用して、一般水質測定用に1Lのポリビンに採水し、その他の分析用に1Lの褐色ガラス瓶に採水した。採取した試料水は、迅速に濃縮操作を行った。一般水質は、工場排水試験法⁹⁾に基づいて、水温、DO、pH、EC、SS、BOD、COD、T-N、T-Pについて測定を行った。

2・2 化学分析

河川水を褐色ガラス瓶に採水し、SepPackPS2カートリッジ（Waters社）を用いて固層抽出法により濃縮操作を行った。アルキルフェノール類（ノニルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール、4-*t*-ブチルフェノール、4-*n*-ブチルフェノール、4-*n*-オクチルフェノール）、ビスフェノールAおよびエストラジオール類の分析は、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）」²⁾に基づき、GC/MSにより分析を行った。農薬類の分析については、上水試験法³⁾に基づきGC/MSまたはHPLCにより分析した。

2・3 バイオアッセイ

河川水を褐色ガラス瓶に採水し、SepPackPS2カートリッジ（Waters社）に20ml/minの流速で1L通水した。カートリッジから間隙水を除き、10mlの酢酸エチルにより抽出操作を行った。酢酸エチルを窒素吹きつけにより、蒸発乾固させ、ジメチルスルホキシド（DMSO）1mlに転用しバイオアッセイ用の試料とした。

ヒトエストロゲンレセプターを導入された酵母⁴⁾は、SD（-Leu, -His）寒天培地上で培養し、コロニーを形成させた。いくつかのコロニーから酵母をかき取り、SD（-Leu, -His）培地に植え、30℃で2昼夜、前培養を行った。この培養液をSD（-Leu, -His）培地で10倍に希釈し、600

nmの濁度（Abs600）を測定した。この希釈液50μlに試験用試料2μlを加え、37℃ 4時間培養した後、酵母を回収した。回収した酵母に、1U/mlのTymolase（SIGMA社）、1%のBrijjiを含むZ buffer210μlに懸濁し、37℃、30分インキュベートした。これに5mg/mlのONPGを含むZ buffer 40μlを加え、適度に発色するまで37℃でインキュベートした。発色後、250μlの0.1MのNaCO₃を加え、βガラクトシダーゼによる発色反応を停止した。反応停止後、遠心上清の420nm（Abs420）および560nm（Abs560）の吸光度を測定した。βガラクトシダーゼ活性は、次のように計算した。

$$1\text{単位} = 1000 \times (\text{Abs}420 - 1.75 \times \text{Abs}560) / \text{Abs}600$$

また、検量線は17-β-エストラジオールのDMSO溶液を調整し、10pMから10倍づつ100μMまで作成した。次にそれぞれの濃度での活性値を試験時の最大活性値で除し、最大活性値を100とした相対値で表した。河川抽出物の女性ホルモン活性は、値を検量線から読みとり活性値相当の17-β-エストラジオール濃度換算値（E換算値）として表すことにした。

3 結果及び考察

3・1 一般水質項目

BODやCODなどの有機汚濁の指標は、人間活動に付随する化学物質の汚濁の指標の一つとして重要である。調査地点の一般水質項目の結果を表1に示す。9つの調査地点のうち、F、G、HのCODは約8であり、有機汚濁が進んでいた。またT-Pも他の地点に比べて高く、他の地域に比べ人間活動の影響が顕著であった。特にFは、植物プランクトンが発生しており、SSの値が34と高かった。ほかの地点のCODは、約3.0であり顕著な差はみられなかった。

表1 一般水質項目結果

地 点	気 温	水 温	DO	pH	EC	SS	BOD	COD	T-N	T-P
	℃	℃	mg/L		mS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
A	6.2	8.1	10.0	7.5	7600	8	0.9	3.9	2.3	0.100
B	6.5	9.5	8.2	7.5	6200	5	1.4	4.4	2.1	0.140
C	8.0	7.7	10.0	7.4	270	2	2.0	3.5	1.7	0.080
D	7.5	8.6	11.0	7.3	200	1	3.0	2.1	1.0	0.025
E	7.0	8.8	12.0	7.6	2500	12	0.8	3.4	1.3	0.084
F	8.0	8.7	10.0	7.3	320	34	4.0	8.5	4.3	0.240
G	8.5	12.5	11.0	7.7	4500	14	8.0	8.5	4.0	0.450
H	6.5	10.9	14.0	8.1	7200	10	5.8	8.0	1.9	0.380
I	10.5	11.6	13.0	7.9	540	<1	0.7	2.1	0.9	0.014

表2 アルキルフェノール類の結果

地 点	ビスフェノールA	4-tert-オクチルフェノール	ノニルフェノール	17- α -エスト トラジオール	17- β -エスト ラジオール	エチニルエスト ラジオール
	ug/L	ug/L	ug/L	ng/L	ng/L	ng/L
A	<0.01	<0.003	0.08	<10	<10	<10
B	0.033	0.004	0.10	<10	<10	<10
C	<0.01	<0.003	<0.05	<10	<10	<10
D	0.016	0.011	<0.05	<10	<10	<10
E	0.124	<0.003	<0.05	<10	<10	<10
F	0.014	0.003	0.10	<10	<10	<10
G	0.031	0.006	0.14	<10	<10	<10
H	0.026	<0.003	<0.05	<10	<10	<10
I	0.017	<0.003	<0.05	<10	<10	<10

表3 エストラジオール類，女性ホルモン活性の結果

地 点	女 性 ホ ル モ ン 活 性 (E換 算 値)		アルキルフェノール類 のE換 算 値
	pM	pg/L	pg/L
A	0.15	41	52
B	0.30	82	67
C	<0.1	<30	0
D	<0.1	<30	1
E	<0.1	<30	7
F	<0.1	<30	66
G	<0.1	<30	93
H	<0.1	<30	2
I	0.19	53	1

3・2 化学分析

化学分析では、内分泌攪乱化学物質のうちビスフェノール A、4-tert-オクチルフェノール、ノニルフェノールおよびエストラジオール類を測定した。各物質の測定結果を表2に示す。ビスフェノール A は、9地点のうち7地点のほとんどの地点で検出され、広範囲に汚染が広がっていることが明らかとなった。濃度範囲は、他の報告値と（約0.01 μ g/L）同じレベルであった。また、有機汚濁の進行していない地点でも検出され、人間活動により排出されているのではなく、環境中に散在する廃プラスチック製品などから溶出している可能性が示唆された。

ノニルフェノールや4-tert-オクチルフェノールは、地点の差異が多少あるが、9地点中4地点で検出された。また、EやFのような比較的有機汚濁が進行している地点

では、両物質が検出された。このことから、これらの物質の排出には、有機汚濁が排出される人間活動が関与していることが示唆された。濃度レベルは、他の報告値と（1～0.1 μ g/L）と同じレベルであり、生態系にすぐに影響を及ぼすレベルではなかった。

エストラジオール類は、女性ホルモンそのものであり、生態系への影響が大きい。今回の試験では、検出される地点はなかったが、検出限界を下げて分析し、汚染実態を解明する必要があると思われる。

3・3 バイオアッセイ

酵母ツーハイブリッド法を用いたバイオアッセイでは、0.1nM（約30ng/L）の17- β -エストラジオールにより反応した。そこで、濃縮倍率（1000倍）を乗じて検出

下限を0.1pM (約30pg/L) とした。各調査地点の結果を表3の女性ホルモン活性(E換算値)に示す。調査地点のうちA, B, Iの3地点で女性ホルモン活性が検出された。女性ホルモンの17-β-エストラジオールは、生体内では約1nM で作用を始める。このことから考えて、検出された女性ホルモン活性は前述の濃度の1000分の1以下であり、生物濃縮を考慮しなければ生態系に対するリスクは低いと考えられた。

バイオアッセイと化学分析の結果を比較するため、大阪大学酵母法における17-β-エストラジオールを1としたときのノニルフェノールおよびビスフェノールAの作用強度換算値⁹⁾を用いた。化学分析から得られた各濃度値に作用強度換算値を乗じることにより、17-β-エストラジオール濃度換算値(E換算値)を計算し、その結果を表3の化学分析の結果のE換算値に示す。B, I地点の女性ホルモン活性は、化学分析のE換算値よりも高く、化学分析では検出できない内分泌攪乱化学物質の存在を示していた。

また、そのほかの地点では、化学分析の結果が女性ホルモン活性を上回っていた。特にこの現象は、有機汚濁が進んでいるF, G地点で顕著である。このような現象は他県においても報告があり、河川水抽出物中の物質がバイオアッセイを阻害している可能性があげられている⁶⁾。このような試料については、イオン交換などにより抽出物を分画する等の工夫が必要と考えられる。さらに、今回は女性ホルモン阻害活性について検討できなかったが、E, Fの2地点のように阻害物質の存在可能性が高い場合については、同時に検討していく必要がある。

4 まとめ

1. ビスフェノール A は、9地点のうち7地点で検出され、広範囲に汚染が広がっていることが明らかとなった。濃度範囲は、他の報告値と(約0.01μg/L)同じレベルであった。
2. ノニルフェノールや4-tert-オクチルフェノールは、9地点中4地点で検出された。また、比較的有機汚濁が進行している地点では、両物質が検出された
3. 県内の3地点で女性ホルモン活性が検出され、0.15から0.30pM であり、生態系に対するリスクは低いと考えられた。
4. バイオアッセイと化学分析の結果を比較し、バイオアッセイによる包括的評価方法が有効であることが分かった。また、県内の河川においても化学分析により検出できない内分泌攪乱化学物質の存在が示唆された。
5. 化学分析の17-β-エストラジオール濃度換算値(E

換算値)が、バイオアッセイの結果を上回るものがあった。また、このような試料に関しては、バイオアッセイの阻害物質の影響を考慮し、分画などの操作を検討する必要がある。

5 行政的意義、貢献

バイオアッセイを用いたリスク評価方法は、他種類の化学物質の影響の包括的評価が利点である。今回、化学分析から予想される環境ホルモン活性を上回る活性をバイオアッセイにより検出でき、県内の河川水質の環境ホルモンによる影響を包括的に評価することが可能であった。このように、本方法は県内の河川環境の評価においても非常に有効であり、調査研究の継続により県内の環境ホルモンリスクを考えるための基礎資料作りに寄与できる。

文 献

- 1) 工場排水試験法
- 2) 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質, 底質, 水生生物), 環境省
- 3) 上水試験法, 厚生労働省
- 4) J.Nishikawa et al, Toxicology and applied Pharmacology, 154, 76-83, 1999
- 5) 嶋津暉之ら, 東京都環境科学研究所年報, 165-175, 2000
- 6) 中室克彦ら, 水環境学会誌, 25, 403-408, 2002